

創薬初期段階における UDP-glucuronosyltransferase 基質の ヒト体内動態予測法に関する研究

富山大学大学院医学薬学教育部

生命薬科学専攻

薬剤学研究室

中森 文洋

論文要約

近年、医薬品の研究開発費は膨らみ続ける一方、新薬開発の成功確率はいまだ低下している。成功確率の低下を招く主たる要因として「有効性及び安全性の欠如」が報告されている。薬物が薬効を示すためには、血中あるいは標的臓器中における薬物濃度が有効濃度を満たす必要がある。また、薬物の血中濃度が副作用発現濃度に達してしまうと、毒性が惹起される。そのため、血中濃度を精度良く予測できないことが、「有効性及び安全性の欠如」を起因とした臨床試験失敗の一因であると考えられ、血中濃度の予測精度を向上させることが、新薬開発の成功確率を高めることに繋がると期待される。薬物動態研究は吸収、分布、代謝及び排泄を対象として構成される。特に薬物代謝に関する研究の成果は、これまでに創薬初期段階における代謝安定性に関する最適化や臨床用量の設定の際に中心的な役割を果たし、開発確率の向上に貢献してきた。ただし、これらの手法の多くは代謝酵素の一つ、cytochrome P450 (CYP) により肝臓において代謝されることを前提にしている。ここ50年でシーズとなる薬物の物理化学的性質は多様化している。CYPに対する安定性を向上するために導入される水酸基やカルボン酸などの極性官能基はCYP以外の酵素で代謝されることが知られている。特にUDP-glucuronosyltransferase (UGT) により、グルクロン酸抱合を受ける薬物の数はCYPに次いで多く、ヒトの体内動態に大きな影響を与えていることが知られている。しかしながら、UGTの基質となる薬物に関しては、ヒトの体内動態予測法は確立されておらず、体内動態が原因で開発中止になるリスクが存在する。そこで本研究では、グルクロン酸抱合を受ける薬物に関して、ヒト体内動態予測法を確立することを目的とした。

1. ラット肝臓におけるグルクロン酸抱合の*in vitro-in vivo*相関

多くの薬物は肝臓で代謝され、生体内より排泄・除去される。したがって、血中濃度、さらにバイオアベイラビリティや半減期を規定するパラメーターである肝クリアランスを定量的に*in vitro*から予測することは、ヒト体内動態予測法の確立において重要である。肝クリアランスは生理学的モデル及びクリアランスコンセプトにより、肝ミクロゾーム単位のクリアランス (*in vivo*肝固有クリアランス： $CL_{int, in vivo}$) にスケールダウンすることができる。一方、CYP代謝に関しては肝ミクロゾームを用いた実験で得られた活性値からは*in vitro*肝固有クリアランス ($CL_{int, CYP}$) が算出される。CYPで代謝される薬物においては、 $CL_{int, CYP}$ と $CL_{int, in vivo}$ の相関に関して広く研究されている。しかしながら、グルクロン酸抱合に関しては、*in vitro*と*in vivo*との相関に関する研究は限られている。そこで、本研究ではグルクロン酸抱合を受ける10化合物について、ラット肝ミクロゾームを用いた*in vitro*代謝実験にて評価した*in vitro*グルクロン酸抱合固有クリアランス ($CL_{int, UGT}$) と $CL_{int, in vivo}$ との相関を検討した。 $CL_{int, UGT}$ は薬物を活性化した肝ミクロゾーム中でグルクロン酸抱合させた際の未変化体の消失から算出した (0.11-4500 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$)。非結合型の $CL_{int, UGT}$ ($CL_{uint, UGT}$) は、反応液中の非結合型分率 ($f_{u, mic}$) により補正し求めた (0.11-9600 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$)。ラットに静脈内投与後の尿胆汁中に排泄されるグルクロン酸抱合体を定量し、グルクロン酸抱合の全身クリアランスへの寄与率を求めた (12.0-76.6%)。 $CL_{int, in vivo}$ は血漿中タンパク結合率、血球移行性、グルクロン酸抱合の寄与率及び*in vivo*データより、dispersion modelを用いて算出した (5.7-9000 $\text{mL}/\text{min}/\text{kg}$)。Dispersion modelは肝クリアランスと $CL_{int, in vivo}$ の関係式で、動物実験で得られた肝クリアランスを $CL_{int, in vivo}$ に変換することができる。各化合物について、 $CL_{int, UGT}$ 及び $CL_{int, in vivo}$ を比較し、scaling factor ($SF = CL_{int, in vivo}/CL_{int, UGT}$) を評価した。SFの相乗平均は、 $CL_{int, UGT}$ を $f_{u, mic}$ により補正しない場合及び $f_{u, mic}$ を補正した場合で、それぞれ、

4.1及び2.8であった。 $f_{u, mic}$ を補正した場合、SFが2倍以内及び10倍以内であった化合物数は、それぞれ6化合物及び10化合物であった。本検討で得られた乖離はこれまで報告されている*in vitro*と*in vivo*の乖離と比較して小さく、 $CL_{uint, UGT}$ が $CL_{int, in vivo}$ に近いと考えられた。したがって、ラットにおいて*in vitro*代謝実験からグルクロン酸抱合によるクリアランス予測は可能となると考えられた。

2. グルクロン酸抱合を受ける薬物の*in vivo*ヒト肝固有クリアランスの予測

グルクロン酸抱合を受ける12化合物について、ラット、サル及びヒト肝マイクロゾームを用いた*in vitro*代謝実験及び動物PKデータから*in vivo*ヒト肝固有クリアランスの定量的予測について検討した。 $CL_{int, in vivo}$ は血漿中タンパク結合率、血球移行性及び*in vivo*データよりdispersion modelを用いて算出した。多くの化合物はCYPによっても代謝されることが知られている。したがって、 $CL_{int, in vitro}$ は、薬物を肝マイクロゾームでCYPまたはUGTに至適な条件で反応させた際の未変化体の消失からそれぞれ算出した $CL_{uint, CYP}$ 及び $CL_{uint, UGT}$ を和したものと定義した。各化合物について、 $CL_{int, in vitro}$ 及び $CL_{int, in vivo}$ を比較し、scaling factor ($SF = CL_{int, in vivo} / CL_{int, in vitro}$)を評価した。ヒトSFの値は0.1-42.8を示し、化合物間で大きな違いを示した。ヒトSFの相乗平均は3.4を示し、 $CL_{int, in vivo}$ が $CL_{int, in vitro}$ より大きい傾向を示した。ラット及びサルにおけるSFの相乗平均も、それぞれ5.7及び1.7を示し、ヒトと同様に $CL_{int, in vivo}$ が $CL_{int, in vitro}$ より大きい傾向を示した。そこで、ヒト $CL_{int, in vitro}$ を動物scaling factorで補正することにより、ヒトにおける予測精度が向上するかを検討した。その結果、ラットSF及びサルSFで補正した場合のヒトSFの相乗平均はそれぞれ0.6及び2.0だった。したがって、動物のSFで補正することにより、予測精度の改善が認められた。今回用いた12化合物は、主としてUGT1A1, 1A3, 1A9または2B7によりグルクロン酸抱合を受けることが発現系により示唆された。ヒト肝マイクロゾーム中の

UGT1A9及び2B7のグルクロン酸抱合活性は、BSAの添加により上昇することが知られている。このBSAの効果は、ヒト肝ミクロゾーム中においてグルクロン酸抱合を阻害する不飽和脂肪酸をBSAが吸着するためと考えられている。そこで、動物の肝ミクロゾームでもグルクロン酸抱合活性の上昇が認められるかを検討した。その結果、UGT1A1, 1A3, 1A9の基質に関しては、BSA添加により、ラット、サル及びヒトでグルクロン酸抱合活性が上昇したが、その効果の程度には種差が認められた。一方、UGT2B7の基質に関して、BSA添加によるグルクロン酸抱合活性上昇の効果は、ラット、サル及びヒトで同程度であった。したがって、動物の肝ミクロゾームにおいても不飽和脂肪酸によるグルクロン酸抱合活性阻害が生じていることが示唆された。今回の結果により、グルクロン酸抱合を受ける薬物に関して、*in vitro*代謝試験結果及び動物PKデータから、ヒト肝固有クリアランス予測は可能であると考えられた。またSFが生じる原因の一つは不飽和脂肪酸によるグルクロン酸抱合阻害によるものであることが示唆された。

3. グルクロン酸抱合を受ける薬物のヒト小腸アベイラビリティの予測

UGTは肝臓のみならず小腸にも発現しており、ヒトにおける体内動態に大きな影響を与えていることが知られている。しかしながら、ヒト小腸におけるグルクロン酸抱合がヒト体内動態に与える影響に関して*in vitro*から予測する方法は確立されていない。そこで、本研究では、UGTの基質に関してグルクロン酸抱合を受ける薬物に関して、小腸におけるグルクロン酸抱合が小腸アベイラビリティ (Fg) に与える影響を*in vitro*データから定量的に予測する方法を検討した。モデル化合物として、グルクロン酸抱合を受ける11化合物を選択した。グルクロン酸抱合の小腸固有クリアランス ($iCL_{\text{uint, UGT}}$) は薬物をヒト小腸ミクロゾームを用いてグルクロン酸抱合させた際の未変化体の消失から算出した ($4.00\text{-}4620 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$)。非結合型の $iCL_{\text{uint, UGT}}$ は、反応液中の $f_{u, \text{mic}}$ で補正し求め

た ($5.2\text{--}5133\ \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$)。さらに、ヒトUGT発現系マイクロゾームを用いて、モデル化合物のグルクロン酸抱合に寄与するUGT分子種を同定したところ、多様なUGT分子種が抱合に寄与していることが明らかとなった。一方で、いずれのモデル化合物もヒト小腸マイクロゾーム中のCYP代謝には安定的であった。人工脂質膜を用いて評価した膜透過性データとヒトPKデータから、モデル化合物のヒト吸収性は良好であることが示唆された。ヒト血球移行性及び*in vivo*データより算出したFaFg (0.01-1.0)は、 $i\text{CL}_{\text{int, UGT}}$ と逆相関を示し、simplified intestinal availability model (SIA model) にfittingすることができた。SIA modelとは代謝クリアランスと経験的な定数のみからヒト小腸アベイラビリティを予測する記述式である。これまでは、膜透過が良好且つCYPで代謝される薬物に関してのみ適応されていた。今回の検討により、初めてグルクロン酸抱合を受ける薬物に関しても適応できることが明らかとなった。これらの知見により、グルクロン酸抱合を受ける薬物に関して、ヒト小腸マイクロゾームによる $i\text{CL}_{\text{int, UGT}}$ とSIA modelを組み合わせることにより、ヒトFaFg予測は可能となると考えられた。

4. 結論

本研究において、グルクロン酸抱合を受ける薬物に関して、*in vitro*代謝試験結果及び動物PKデータからヒト体内動態を予測する方法を確立した。これらの成果を基に、肝及び小腸マイクロゾームを用いた*in vitro*代謝試験で、グルクロン酸抱合に安定な化合物を選択することで、ヒトで良好な薬物動態を示す化合物の創製につながると考えられた。さらに、ヒトにおける体内動態を定量的に予測することにより、妥当な推定臨床用量の設定、延いては合理的な臨床試験デザインの立案に貢献できると考えられた。

参考文献

- 1) Nakamori F, Naritomi Y, Furutani M, Takamura F, Miura H, Murai H, Terashita S and Teramura T. Correlation of Intrinsic *in vitro* and *in vivo* Clearance for Drugs Metabolized by Hepatic UDP-glucuronosyltransferases in Rats. Drug Metab. Pharmacokinet. 26(5)465-473 (2011)
- 2) Nakamori F, Naritomi Y, Hosoya K, Miyashita A, and Usui T. Quantitative Prediction of Human Hepatic Glucuronidation Clearance Using In Vitro Data and Animal Pharmacokinetic Data. (in preparation)
- 3) Nakamori F, Naritomi Y, Hosoya K, Moriguchi H, Tetsuka K, Furukawa T, Kadono K, Yamano K, Terashita S and Teramura T. Quantitative Prediction of Human Intestinal Glucuronidation Effects on Intestinal Availability of UDP-glucuronosyltransferase Substrate Using In vitro data. Drug Metab. Dispos. 40 (9)1771-1777 (2012)